

PONTUS EUXINUS  
ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ XII



ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ – 2021

XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием по проблемам водных экосистем, посвященная 150-летию Севастопольской биологической станции – ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»

Материалы конференции

Севастополь, 20–24 сентября 2021 г.

Севастополь  
ФИЦ ИНБЮМ  
2021

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

### ТАКСОН-СПЕЦИФИЧНЫЙ МЕТАБАРКОДИНГ КАК СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВ СОЛНЕЧНИКОВ В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Герасимова Е. А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН,  
г. Оренбург

*Ключевые слова: центрохелидные солнечники, центрохелиды, метабаркодинг, высокопроизводительное секвенирование, ген 18S рРНК, соленые водоемы*

Центрохелидные солнечники, или центрохелиды (Centropasthelida Febre-Chevalier et Febre, 1984) – свободноживущие хищные гетеротрофные безжгутиковые протисты, относящиеся к хакробиям. Центрохелидные солнечники характеризуются шаровидным телом с радиально расходящимися аксоподиями, несущими стрекательные органеллы для захвата пищи. Центрохелиды характеризуются всеветным распространением, населяют морские и пресноводные экосистемы, выполняя роль консументов высшего порядка. В настоящий момент группа насчитывает чуть более 100 видов, однако данные секвенирования ампликонов 18S рДНК из природных местообитаний указывают на то, что 90 % солнечников до сих пор не изучены, а истинное разнообразие группы значительно шире, в связи с чем потенциально новые виды все еще ждут своего описания. Практически каждое обстоятельное исследование или экологический скрининг, ориентированный на данную группу, выявляет новые таксоны или нуклеотидные последовательности солнечников, что обуславливает необходимость их дальнейшего изучения.

Одним из современных молекулярно-генетических методов, применяемых для изучения таксономической структуры (богатства и разнообразия) сообществ протистов, является метабаркодинг на основе высокопроизводительного секвенирования, позволяющего секвенировать одновременно миллионы целевых фрагментов ДНК из образцов окружающей среды. Метабаркодинг широко применяется для описания глобального таксономического разнообразия как отдельных групп протистов, так и сообществ в целом. В нашем исследовании таксон-специфичный метабаркодинг был применен для оценки генетического разнообразия и таксономической структуры сообществ центрохелидных солнечников в соленых континентальных водоемах России с широким диапазоном солености (1-78‰). Метод позволил выявить 193 ОТЕ центрохелид, оценить генетическое разнообразие и полиморфизм в пределах одного вида, а также обнаружить новые генотипы и филогенетические линии солнечников.

В результате секвенирования и биоинформатической обработки данных было получено от 11480 до 167877 ридов для каждого образца. Число ридов центрохелидных солнечников в образце варьировало от 7 до 5745 (0,02–16,21%) для накопительных культур и от 8 до 385 (0,01–0,52%) – для природных образцов. Число ОТЕ солнечников в одной библиотеке варьировало от 1 до 52 (0,32–17,05%) в накопительных культурах и от 1 до 11 (0,05–0,80%) – в природных образцах. Общее количество операционных таксономических единиц (ОТЕ) солнечников составило

193 (52 – в природных образцах и 141 – в накопительных культурах). Длина фрагмента гена 18S (регион V7) варьировала в пределах 276–533 п.н.

Для оценки возможных филогенетических связей, выявленных ОТЕ, было построено филогенетическое дерево методом максимального правдоподобия, а также проведено сравнение молекулярных сигнатур в шпильке 39es9 региона V7. В итоге подавляющее большинство выявленных ОТЕ локализовалось в пределах известных филогенетических клад, относящихся к надотрядам *Pterocystida* и *Panacanthocystida*. Часть ОТЕ группировалась с кладами, соответствующими описанным таксонам солёноководов, а часть – с природными кладами, содержащими последовательности, полученные при секвенировании природных образцов и не имеющие морфологической и таксономической характеристики.

Две последовательности из образца с солёностью (2‰) образовали хорошо поддерживаемый кластер с высокой бутстреп поддержкой 83% с последовательностью *Pterocystis canadensis* AY749633, выделенной из горячего пресноводного источника и природной последовательностью «unid\_helio6 AY749606» из почвенного образца в кладе *Pterocystidae* C. Одна ОТЕ-31-210 (2‰) образовывала кластер с пресноводным изолятом *Pterocystis quadrata* AY749612 в кладе *Pterocystidae* B с умеренной поддержкой (67%). Группа ОТЕ 264-9-122, 264-9-96, 260-9-66, 264-9-138 из образцов с солёностью 2‰ с высокой поддержкой группировалась с последовательностью *Acanthocystis aff. myriospina*, как по молекулярным сигнатурам, так и по результатам филогенетического анализа. Одна ОТЕ-257-9-259 (20‰) имела неопределённую позицию в кладе *Acanthocystis*, но учитывая высокую поддержку с представителями рода *Acanthocystis* и высокое сходство последовательностей, она также является представителем этого рода. Результаты филогенетического анализа и проверки молекулярных сигнатур указывали на близкое родство ОТЕ-31-1022 (2‰) с *Raphidocystis ambigua*, преимущественно пресноводным видом.

Наконец, 131 ОТЕ из культур образовали хорошо поддерживаемый кластер (86%) с *Raphidocystis contractilis* AB196984, выделенным из солоноватого местообитания. Молекулярные сигнатуры данных ОТЕ явно указывают на ко-специфичность сиквенсов, но также демонстрируют некоторый уровень альтернативного полиморфизма между данными ОТЕ.

Пара ОТЕ (31-120, 30-115) из образцов с солёностью 2‰ расположилась на дереве в *Heterophryidae*, но их позиция имела незначительную бутстреп поддержку, а анализ молекулярных подписей показал идентичность с двумя пресноводными последовательностями, известными как клада H5. Две ОТЕ 261-9-18 (2‰) и 38-130 (14‰) образовали кладу с представителями *Marophrys*, но не демонстрировали очевидной гомологии молекулярных подписей ни с представителями *Marophrys*, ни с другими центрохелидами; в целом клада *Marophryidae* имела незначительную поддержку.

Большая группа ОТЕ, состоящая из 23 последовательностей из широкого диапазона солёности (2-78‰), сформировала новую, умеренно поддерживаемую (76%) кладу, сестринскую с пресноводной последовательностью AY821944 в надотряде *Pterocystida*. Данная клада была обозначена «NC9» и делилась на четыре подклады, представители которых обладали уникальными молекулярными сигнатурами. Среди них NC9.1, NC9.2 и NC9.4 были монофилетическими, а NC9.3 – парафилетической. Во всех четырех подкладах NC9 схожие или идентичные генотипы были получены из биотопов с контрастно разными значениями солёности.

ОТЕ-30-911 из образца с солёностью 2‰ формировала с четырьмя морскими последовательностями незначительно поддерживаемую кладу, сестринскую с NC5. Анализ молекулярных сигнатур показал, что ОТЕ-30-911 представляет собой новый

генотип, содержащий вставку 34 п.н., не имеющий очевидной гомологии с какой-либо последовательностью солнечников в базе данных GenBank.

Пять ОТЕ 30-177 (2%), 36-900 (1%), 30-293 (2%), 261-9-18 (2%), 38-130 (14%) не были надежно идентифицированы ни с использованием филогенетического анализа, ни путем сравнения молекулярных сигнатур. Скорее всего, они представляют первых представителей малоизученных линий, но было бы преждевременным присвоить им имя «природной клады», поскольку единственными доступными в настоящее время данными являются короткие последовательности только для 1-2 ОТЕ из каждой группы.

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДИК МОНИТОРИНГА МОРСКОГО МИКРОМУСОРА ДЛЯ ПЕСЧАНЫХ ПЛЯЖЕЙ ФИНСКОГО ЗАЛИВА БАЛТИЙСКОГО МОРЯ**

**Кузьмина А. С., Ершова А. А.**

Российский государственный гидрометеорологический университет,  
г. Санкт-Петербург

*Ключевые слова:* микромусор, песчаные пляжи, «фрейм-метод», «рейк-метод», микропластик

Мониторинг пляжного мусора в настоящее время является наиболее экономически эффективным способом контроля количества и характера морского мусора. В Российской части Балтийского региона мониторинговые исследования пляжного мусора проводятся на протяжении нескольких лет с использованием различных методик [1].

Целью данного исследования является сравнение методик мониторинга морского микромусора для песчаных пляжей Финского залива. Исходя из цели поставлены следующие задачи: рассмотреть две методики, используемые на песчаных пляжах восточной части Финского залива Балтийского моря; представить результаты их полевого применения на песчаных пляжах восточной части Финского залива; определить их преимущества и недостатки, сформировать возможные рекомендации по усовершенствованию.

Пробы микромусора отбирались в период с 2018 по 2020 гг. в летние месяцы на пляжах Невской губы и открытой части Финского залива. Для исследований параллельно применялись две методики отбора проб микромусора. «Фрейм-метод» направлен на детальное изучение зоны заплеска (то есть зоны воздействия волн и накопления материала) с полигоном площадью 40 м<sup>2</sup> для отбора мусора величиной более 5 мм и двумя квадратами со стороной 1 м для отбора частиц размером 2–5 мм. Для этого используется металлическое сито диаметром ячейки 2 мм. «Рейк-метод» направлен на изучение более обширных зон побережья (от зоны заплеска до линии растительности) с полигоном площадью 50 м<sup>2</sup>. Для этого метода предполагается использование специальных «граблей» для просеивания песка также с ячейкой 2 мм. Данные методики применяются для исследования Балтийских пляжей в Германии и Литве [2], что делает возможным сравнение уровней загрязненности.

При использовании данных методик в полевых условиях получены следующие результаты. В 2018 году с помощью первой методики было исследовано 1360 м<sup>2</sup> пляжей, в том числе 68 м<sup>2</sup> на содержание микромусора. Среднее содержание микромусора в Невской губе составило 21 частица на м<sup>2</sup>, в открытой части залива –